

## (12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004年12月2日 (02.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/103403 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 39/395, A61P 37/06,  
1/16, 11/06, 19/02, 3/10, 9/10, 11/10

Hongyan) [CN/JP]; 〒0650012 北海道札幌市東区北  
12条東9丁目1-H2-1120号 Hokkaido (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/007321

(74) 代理人: 小野信夫, 外(ONO, Nobuo et al.); 〒1010024  
東京都千代田区神田和泉町1-13-1 水戸部ビル  
4階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2004年5月21日 (21.05.2004)

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,  
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY,  
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,  
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-146188 2003年5月23日 (23.05.2003) JP

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社免疫生物研究所 (IMMUNO-BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒3750005 群馬県藤岡市中字東田1091-1 Gunma (JP). 株式会社ジーンテクノサイエンス (G-IN TECHNO SCIENCE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17-2-1 Hokkaido (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 今重之 (KON, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒0010905 北海道札幌市北区北17条西6丁目20番地318パークホームズ北大前803号 Hokkaido (JP). 上出利光 (UEDE, Toshimitsu) [JP/JP]; 〒0040835 北海道札幌市清田区真栄5条3丁目8-2 Hokkaido (JP). ディオコウエン (DIAO,

WO 2004/103403 A1

(54) Title: IMMUNOCOMPETENT CELL ACTIVATION INHIBITOR AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 免疫担当細胞活性化阻害剤およびその用途

(57) Abstract: An immunocompetent cell activation inhibitor comprising an antibody against OPN or fragment peptide portion thereof; a therapeutic agent for diseases attributed to immunocompetent cell activation, comprising this inhibitor as an active ingredient; and a method of treatment with the use of the therapeutic agent. Thus, there can be provided a medical agent capable of treating diseases attributed to immunocompetent cell activation, such as hepatopathy, spasmotic asthma, articular inflammation, diabetes, lupus, insular sclerosis, arteriosclerosis and lung fibrosis, etc.

(57) 要約: 本発明はOPNまたはそのフラグメントペプチド部分に対する抗体を含有する免疫担当細胞活性化阻害剤および前記阻害剤を有効成分とする免疫担当細胞の活性化を原因とする疾患の治療薬ならびにそれを用いた治療法に関する。本発明によれば免疫担当細胞の活性化を原因とする疾患、例えば肝障害、喘息、関節炎、糖尿病、狼瘡、多発性硬化症、動脈硬化、肺線維症等を治療しうる薬剤等を提供することができる。

## 明細書

### 免疫担当細胞活性化阻害剤およびその用途

#### 技術分野

本発明は、オステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する抗体を含有する免疫担当細胞活性化阻害剤およびその用途に関する。

#### 背景技術

B細胞、マクロファージ、樹状細胞、T細胞、NKT細胞、好中球等の免疫担当細胞は、体内の免疫系等に関与するものである。

しかし、これら免疫担当細胞が異常に活性化することにより、種々の疾患、例えば、肝障害 (Kaneko Y., et al., J. Exp. Med., 2000, Jan 3;191(1):105-14、Nakamura K., et al., J. Hepatol., 2001, Aug;35(2):217-24、Tiegs G., et al., J. Clin. Invest. 1992 Jul;90(1):196-203)、喘息 (Akbari O., et al., Nat. Med., 2003, May;9(5):582-8、Linden A., Int. Arch. Allergy Immunol., 2001, Nov;126(3):179-84、Corrigan CJ., Chem. Immunol., 2000;78:39-49)、関節炎 (Chiba A., et al., Infect. Immun., 2003, Oct;71(10):5447-55、Nurieva RI., J. Clin. Invest., 2003, Mar;111(5):701-6、Taylor PC., Curr. Opin. Pharmacol., 2003, Jun;3(3):323-8.)、糖尿病 (Hong S., et al., Nat. Med. 2001, Sep;7(9):1052-6、Hahn HJ., Diabetes Metab. Rev., 1993, Dec;9(4):323-8)、狼瘍 (Zeng D, J Clin Invest. 2003 Oct;112(8):1211-22、Olive D., et al., Crit. Rev. Ther Drug Carrier Syst.. 1993;10(1):29-63)、多発性硬化症 (Singh AK., J. Exp. Med., 2001, Dec 17;194(12):1801-11、Maatta JA., et al., J. Neuroimmunol., 1998, Oct 1;90(2):162-75、Milici AJ., et al., Lab. Invest., 1998, Oct;78(10):1239-44)、動脈硬化 (Tupin E., et al., J. Exp. Med., 2004, Feb 2;199(3):417-22)、肺線維症 (Keane MP., et al., J. Immunol., 1999, May 1;162(9):5511-8、Hu H., et al., J Leukoc. Biol., 1993, Nov;54(5):414-22) 等の疾患が引き起こされることが示

唆されている。

上記のような免疫担当細胞の活性化等により引き起こされる疾患は、発症のメカニズムが複雑であるため治療が困難であることが多かった。

従って、本発明は上記疾患を治療しうる薬剤を提供することをその課題とする。  
。

### 発明の開示

本出願人らは、先に、骨に多く含まれる酸性のカルシウム結合性の糖蛋白質であるオステオポンチン（以下、「OPN」という）またはそのフラグメントペプチド部分に対する抗体（以下、「OPN阻害抗体」という）が、自己免疫疾患、リウマチおよびリウマチ性関節炎の治療（WO 02/081522号パンフレットおよびWO 03/027151号パンフレット）、結核診断剤（特開2003-294735号公報）、腱・韌帯の劣化予防剤（特願2003-389543号）、間質性肺炎診断剤（特願2003-194977号）等として利用しうることを見出し、先に特許出願をしている。

更に本出願人らは、OPN阻害抗体の利用を拡大すべく、鋭意研究を行っていたところ、OPNまたはそのフラグメントペプチド部分が前記の免疫担当細胞の活性化に関与していることを見出した。そして、OPN阻害抗体でOPNまたはそのフラグメントペプチド部分を阻害することにより免疫担当細胞の活性化を抑制することを見出した。

また、このOPN阻害抗体を利用することで、免疫担当細胞の活性化を原因とする疾患等の治療薬となることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) オステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する抗体を含有する免疫担当細胞活性化阻害剤。

(2) オステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する抗体が、RGD配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害し、かつSVVYGLR配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害する抗体である(1)記載の

免疫担当細胞活性化阻害剤。

(3) オステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分が、オステオポンチンのN末端フラグメントである(1)記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

(4) オステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分が、次の(A)で示されるペプチドを含むペプチドである(1)記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

(A) R G D S V V Y G L R

(5) オステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分が、次の(B)で示されるペプチドを含むペプチドである(1)記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

(B) V D T Y D G R G D S V V Y G L R S

(6) 免疫担当細胞が、NKT細胞である(1)ないし(5)の何れかに記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

(7) NKT細胞のIFN- $\gamma$ 産生を阻害するものである(6)記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

(8) NKT細胞のMIP-2産生を阻害するものである(6)記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

(9) NKT細胞のIL-4産生を阻害するものである(6)記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

(10) 免疫担当細胞が、好中球である(1)ないし(5)の何れかに記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

(11) 免疫担当細胞が、T細胞である(1)ないし(5)の何れかの項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

(12) T細胞が、CD4 $^{+}$ T細胞である(11)記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

(13) Fas/FasL媒介細胞障害を阻害するものである(1)ないし(12)の何れかに記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

(14) 好中球媒介細胞障害を阻害するものである(1)ないし(12)の何れかに記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

(15) (1) ないし (14) の何れかに記載の免疫担当細胞活性化阻害剤を有効成分とする免疫担当細胞の活性化を原因とする疾患の治療薬。

(16) 免疫担当細胞が、NKT細胞、好中球、T細胞から選ばれる免疫担当細胞の1種以上である(15)記載の疾患の治療薬。

(17) 免疫担当細胞の活性化を原因とする疾患が、肝炎、喘息、関節炎、糖尿病、狼瘡、多発性硬化症、動脈硬化、肺線維症から選ばれる疾患である(15)または(16)記載の疾患の治療薬。

(18) (1) ないし (14) の何れかに記載の免疫担当細胞活性化阻害剤を有効成分とする肝障害の治療薬。

(19) 肝障害が、ウイルス性肝炎または薬物性肝炎である(18)記載の肝障害の治療薬。

(20) 肝障害が、自己免疫性肝炎である(18)記載の肝障害の治療薬。

(21) 肝細胞の壊死を抑制するものである(18)ないし(20)の何れかに記載の肝障害の治療薬。

(22) 免疫担当細胞の活性化を原因とする疾患の患者に、(15)ないし(17)の何れかに記載の治療薬を投与することを特徴とする当該疾患の治疗方法。

(23) 肝障害患者に、(18)ないし(21)の何れかに記載の肝障害の治療薬を投与することを特徴とする肝障害の治疗方法。

#### 図面の簡単な説明

図1は、血清中のALT値を示す図面である。

図2は、HE染色した肝炎組織の図面である。

図3は、肝炎組織の顕微鏡視野中の壊死の細胞数の比率を示す図面である。

図4は、肝炎モデルマウスにおける肝臓内のOPNの発現量を示す図面である。

。

図5は、肝炎モデルマウスのウエスタンプロットの結果を示す図面である。矢印は、トロンビン切断型OPNを示している。

図6は、野生型マウスおよびOPN欠損マウスのConA投与後の血清中のALT値を示す図面である。

図 7 は、野生型マウスおよびOPN欠損マウスのCon A投与後の生存率を示す図面である。

図 8 は、肝炎モデルマウスの細胞内サイトカイン染色の結果を示す図面である（左図は肝臓内白血球中のリンパ球を抗NK1.1抗体とTCR抗体とで染色した結果を示す。中央図（R1）はNK1.1<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup>であるNKT細胞集団画分、右図（R2）は、NK1.1<sup>-</sup>TCR<sup>+</sup>であるT細胞集団画分におけるOPN発現をFACS解析した結果を示す。）。

図 9 は、肝炎モデルマウスの肝臓内から分離したNKT細胞およびT細胞の細胞培養上清中におけるOPN量をELISA法で測定した結果を示す図面である。

図 10 は、肝炎モデルマウスの肝臓内から分離したNKT細胞およびT細胞から抽出したmRNAをRT-PCR法にて増幅させ、各々の細胞が有するOPN受容体およびMIP-2を検出した結果を示す図面である。

図 11 は、肝炎モデルマウスおよび野生型マウスから得られた肝浸潤白血球のトロンビン切断型OPNに対する細胞遊走試験の結果を示す図面である。

図 12 は、肝炎モデルマウスから得られた肝浸潤白血球のトロンビン切断型OPNに対する細胞遊走阻害試験の結果を示す図面である。

図 13 は、肝炎モデルマウスの肝臓内における、M5抗体およびコントロール抗体投与時のCD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞の割合をFACS解析した結果を示す図面である。

図 14 は、肝炎モデルマウスの肝臓内における、M5抗体およびコントロール抗体投与時のCD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞数をFACS解析した結果から、活性化CD4<sup>+</sup>T細胞数を算出した結果を示す図面である。

図 15 は、野生型マウスとOPN欠損マウスにそれぞれCon Aを投与してから6時間後の肝臓内浸潤細胞中の好中球、CD4<sup>+</sup>T細胞、マクロファージ数を、FACS解析にて算出した結果を示す図面である。

図 16 は、野生型マウスにCon Aを投与してから24時間後の肝臓組織を染色した結果を示す図面である（左図は、MPO抗体を用いて免疫染色した結果を示し、右図はHE染色した結果を示す。）。

図17は、野生型マウスの腹腔内にカゼインナトリウムを投与して分離した好中球に全長OPN、NハーフOPN、およびCハーフOPNを添加した培養上清中のMPO活性を示す図面である。

図18は、野生型マウスにConAを投与してから6時間後の肝臓内好中球数をFACS解析にて算出した結果を示す図面である。

図19は、野生型マウスへのConA投与後のMIP-2濃度の経時変化を示す図面である。

図20は、野生型マウスへのConA投与後の肝臓内における $\alpha$ 4、 $\alpha$ 9インテグリンmRNAの発現量をリアルタイムPCRで定量した結果を示す図面である（黒丸はコントロール抗体投与のグラフ、白丸はM5抗体投与後のグラフである。）。

図21は、マウス肝臓のNK T細胞およびT細胞の培養上清中におけるIFN- $\gamma$ 量をELISA法で測定した結果を示す図面である。

図22は、M5抗体を投与したConA肝炎マウスと、コントロール抗体を投与したConA肝炎マウスにおける肝臓中のIFN- $\gamma$ 発現量をIFN- $\gamma$ EIA Kit (Pharmingen製) を用いて定量した結果を示す図面である。

図23は、400 $\mu$ gのM5抗体を、ConAを投与する3時間前とConAの投与と同時に各マウスに投与した場合のALT値を比較した図面である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の免疫担当細胞活性化阻害剤（以下、「本発明阻害剤」という）は、OPNまたはそのフラグメントペプチド部分（以下、「OPN等」という）に対する抗体（OPN阻害抗体）を有効成分とし、これを適当な薬学的に許容される担体成分と組み合わされることにより調製される。

本発明において用いられるOPN阻害抗体は、OPN等を認識するものであれば特に制限無く使用することができる。

このようなOPN阻害抗体としては、RGD配列を認識するインテグリンとOPN等との結合を阻害し、かつ、SVVYGLR配列を認識するインテグリンと

O P N 等との結合を阻害するものが好ましく、特に R G D 配列を認識するインテグリン、例えば  $\alpha v \beta 1$  、  $\alpha v \beta 3$  、  $\alpha v \beta 5$  等と O P N - a 、 O P N - b 、 O P N - c またはそれらの N 末端フラグメントとの結合を阻害し、かつ、 S V V Y G L R 配列を認識するインテグリン、例えば  $\alpha 9 \beta 1$  、  $\alpha 4 \beta 1$  、  $\alpha 4 \beta 7$  等と O P N - a 、 O P N - b 、 O P N - c またはそれらの N 末端フラグメントとの結合を阻害するものが好ましい。

ここで N 末端フラグメントとは、 O P N がタンパク質分解酵素等により分解されたフラグメントのうち N 末端側のフラグメントをいう。上記タンパク質分解酵素としては、例えばトロンビンが挙げられる。また、上記の S V V Y G L R 配列は、ヒト O P N ( アクセッションナンバー : J 0 4 7 6 5 ) の 162 番目のセリンから 168 番目のアルギニンまでの配列である。

本発明における O P N 阻害抗体は、上記のような性質を保持する抗体であれば、その製法は特に限定されず、例えば O P N - a 、 O P N - b 、 O P N - c や、これらの N 末端フラグメント、あるいは次の (A) で示されるアミノ酸配列またはその相当配列を含んでいるペプチド ( 以下、これらを「 O P N 関連ペプチド」と総称する ) を抗原として用いることにより作製されたものが使用できる。

R G D S V V Y G L R ( 配列番号 1 ) ( A )

なお、上記の相当配列とは、ヒト以外の動物の O P N における、ヒト O P N の 162 番目のセリンから 168 番目のアルギニンまでの配列 ( S V V Y G L R ) に相当する配列をいい、例えばブタではヒトと同じく S V V Y G L R 、サルでは S V A Y G L R 、マウスやラットでは S L A Y G L R 、ウシでは S V A Y G L K 、ウサギでは S V A Y R L K である。

ヒトについての好ましい O P N 阻害抗体は、例えば、上記 (A) の配列を含んでいるペプチドを抗原として用いることにより作製される。より好ましくは、例えばこの両配列を連続して有する O P N - a ( アクセッションナンバー : J 0 4 7 6 5 ) の 153 番目バリン残基から 169 番目セリン残基までのペプチド (B) を抗原として用い、以下常法に従って処理することによって得ることができる。

V D T Y D G R G D S V V Y G L R S ( 配列番号 2 ) ( B )

また、OPN阻害抗体の作製にあたり、OPN関連ペプチドの抗原性を高めるためには、当該ペプチドと生体高分子化合物との結合物を抗原として用いることが好ましい。このOPN関連ペプチドと結合させる生体高分子化合物の例としては、スカシ貝のヘモシアニン（以下「KLH」という）、卵白アルブミン（以下、「OVA」という）、ウシ血清アルブミン（以下「BSA」という）、ウサギ血清アルブミン（以下「RSA」という）およびサイログロブリン等が挙げられ、このうちKLHおよびサイログリブリンがより好ましい。

上記OPN関連ペプチドと生体高分子化合物との結合は、例えば、混合酸無水物法（B. F. Erlanger et al., (1954): J. Biol. Chem., 234, 1090-1094）または活性化エステル法（A. E. Karu et al., (1994): J. Agric. Food Chem., 42, 301-309）等の公知の方法によって行うことができる。

混合酸無水物法において用いられる混合酸無水物は、OPN関連ペプチドを通常のショッテン-バウマン反応に付すことにより得られ、これを生体高分子化合物と反応させることにより目的とするペプチド-高分子化合物結合体が作製される。この混合酸無水物法において使用されるハロ虫酸エステルとしては、例えばクロロ虫酸メチル、プロモ虫酸メチル、クロロ虫酸エチル、プロモ虫酸エチル、クロロ虫酸イソブチル等が挙げられる。当該方法におけるペプチドとハロ虫酸エステルと高分子化合物の使用割合は、広い範囲から適宜選択され得る。

なお、ショッテン-バウマン反応は塩基性化合物の存在下に行われるが、当該反応に用いられる塩基性化合物としては、ショッテン-バウマン反応に慣用の化合物、例えば、トリエチルアミン、トリメチルアミン、ピリジン、ジメチルアミン、N-メチルモルホリン、ジアザビシクロノネン（DBN）、ジアザビシクロウンデセン（DBU）、ジアザビシクロオクタン（DABCO）等の有機塩基、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウム等の無機塩基等を使用することができる。

また、上記反応は、通常、-20°Cから100°C、好ましくは0°Cから50°Cにおいて行われ、反応時間は5分から10時間程度、好ましくは5分から2時間である。

得られた混合酸無水物と生体高分子化合物との反応は、通常マイナス20°Cか

ら 150°C、好ましくは 0°C から 100°C において行われ、反応時間は 5 分から 10 時間程度、好ましくは 5 分から 5 時間である。混合酸無水物法は一般に溶媒中で行われるが、溶媒としては、混合酸無水物法に慣用されているいずれの溶媒も使用可能であり、具体的にはジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、ジエチルエーテル、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメトキシエタン等のエーテル類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ヘキサメチルリン酸トリアミド等の非プロトン性極性溶媒等が挙げられる。

一方、活性化エステル法は、一般に以下のように行うことができる。まず、OPN 関連ペプチドを有機溶媒に溶解し、カップリング剤の存在下にて N-ヒドロキシコハク酸イミドと反応させ、N-ヒドロキシコハク酸イミド活性化エステルを生成する。

カップリング剤としては、縮合反応に慣用されている通常のカップリング剤を使用でき、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾール、水溶性カルボジイミド等が挙げられる。また、有機溶媒としては、例えば N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド、ジオキサン等が使用できる。反応に使用するペプチドと N-ヒドロキシコハク酸イミド等のカップリング剤のモル比は好ましくは 1 : 10 ~ 10 : 1、最も好ましくは 1 : 1 である。反応温度は、0 ~ 50°C、好ましくは 22 ~ 27°C で、反応時間は 5 分 ~ 24 時間、好ましくは 1 ~ 2 時間である。反応温度は各々の融点以上沸点以下の温度で行うことができる。

カップリング反応後、反応液を生体高分子化合物を溶解した溶液に加え反応させると、例えば生体高分子化合物が遊離のアミノ基を有する場合、当該アミノ基とペプチドのカルボキシル基の間に酸アミド結合が生成される。反応温度は、0 ~ 60°C、好ましくは 5 ~ 40°C、より好ましくは 22 ~ 27°C で、反応時間は 5 分 ~ 24 時間、好ましくは 1 ~ 16 時間、より好ましくは 1 ~ 2 時間である。

上記の方法による OPN 関連ペプチドと生体高分子化合物との反応物を、透析、脱塩カラム等によって精製することにより、OPN 関連ペプチドと生体高分子

化合物との結合物（以下、単に「結合物」ということがある）を得ることができる。

次に、上のようにして得られた結合物を抗原とする抗体の調製にあたっては、公知の方法、例えば続生化学実験講座、免疫生化学研究法（日本生化学会編）等に記載の方法を適宜利用することができる。

すなわち、上記結合体を使用して、本発明のポリクローナル抗体を作製するには、当該結合物で動物を免疫し、当該動物から抗体を採取すれば良い。

例えば、まず、OPN関連ペプチドーサイログロブリン結合物等の結合物をリン酸ナトリウム緩衝液（以下、「PBS」という）に溶解し、これとフロイント完全アジュvantまたはフロイント不完全アジュvant、あるいはミョウバン等の補助剤とを混合したものを、免疫原として用いて、哺乳動物を免疫する。

免疫される動物としては当該分野で常用されるものであればいずれも使用できるが、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等を挙げることができる。また、免疫の際の免疫原の投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射および筋肉内注射のいずれでもよいが、皮下注射または腹腔内注射が好ましい。免疫は、1回または適当な間隔で複数回、好ましくは1週間ないし5週間の間隔で複数回、行うことができる。

次いで、常法に従い、免疫した動物から血液を採取して、血清を分離し、ポリクローナル抗体画分を精製することにより、OPN阻害抗体を得ることができる。

また、常法に従い、前記結合物で動物を免疫して得た免疫細胞と、ミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを得、当該ハイブリドーマの培養物から抗体を採取することによってモノクローナル抗体としてOPN阻害抗体を得ることもできる。

更に、上記したOPN阻害抗体は常法により上記抗体の定常領域を治療対象とするヒトの抗体と同じ定常領域を持つように遺伝子工学的に改変してキメラ抗体（欧州特許公開公報 E P 0 1 2 5 0 2 3 参照）やヒト化抗体（欧州特許公開公報 E P 0 2 3 9 4 0 0 または E P 0 4 5 1 2 6 、国際公開公報 W O 0 3 / 0 2 7 1 5 1 参照）としてもよい。

更にまた、このようにして得られたOPN阻害抗体については、さらに抗原認識領域をプローテアーゼ等で切り出したFv、FabやF(ab')<sub>2</sub>のかたちで用いることもできる。

一方、実験動物としてマウスを用い、OPNに関連する疾患等の研究を行う場合は、マウスのOPNに対応するOPN阻害抗体を用いることが望ましく、そのような抗体は、好ましくは、RGDSLAYGLR配列を含んでいるペプチドを抗原として用いることにより作製される。

以上説明した本発明阻害剤は、上記OPN阻害抗体を有効成分とするものであるが、これを薬学的に許容される担体と組み合わせ、常法に従って製剤化することにより免疫担当細胞の活性化を原因とする疾患の治療薬（以下、「本発明治療薬」という）が得られる。

本発明治療薬における、OPN阻害抗体の患者への投与量としては、患者の症状の程度、年齢や使用する製剤の剤型あるいは抗体の結合力価等により異なるが、通常一日当たり0.1～100mg/kg程度、好ましくは0.5～80mg/kg程度であるから、これに適合した量を用いて製剤化することが好ましい。

また、本発明治療薬の剤型の例としては、注射剤、点眼用剤などの非経口剤が挙げられ、これらには本発明の効果を損なわない範囲で、通常医薬組成物の製造に使用される他の任意成分を加えることができる。このような任意成分としては、例えば、吸着剤、保存剤、抗酸化剤、緩衝剤、キレート剤、着色剤、乳化剤、矯味・香剤、硬化剤、界面活性剤、懸濁化剤、甘味剤、滑沢剤、賦形剤、コーティング剤、流動化剤、光沢化剤、等張化剤、結合剤、增量剤等が挙げられる。

かくして得られる本発明阻害剤により、活性化が阻害される免疫担当細胞としては、マクロファージ、T細胞、NKT細胞、好中球等が挙げられる。これらの免疫担当細胞の中でもT細胞、NKT細胞、好中球の活性化を好適に阻害する。

また、本発明阻害剤は、上記免疫担当細胞の活性化により引き起こされるFas/FasL細胞障害や好中球媒介細胞障害を好適に阻害する。

更に、本発明治療薬により治療ないし改善される疾患としては、特に限定され

ないが、例えば、肝障害、喘息、関節炎、糖尿病、狼瘡、多発性硬化症、動脈硬化、肺線維症等が挙げられる。また、本発明治療薬はこれらの疾患の中でも肝細胞の壊死を好適に抑制できるのでウイルス性肝炎や薬物耐性肝炎等の肝障害、特に自己免疫性肝炎等の急性肝障害に有効な治療薬となる。

本発明阻害剤ないし治療薬の作用機序については、不明な部分があるが、OPNまたはタンパク質分解酵素等により分解されたOPNにより直接的または間接的に引き起こされる免疫担当細胞の活性化を、OPN等に対する抗体（OPN阻害抗体）が阻害すると考えられる。

以下、肝障害を具体例として作用機序を説明する。

まず、コンカナバリンA（以下「Con A」という）誘導性肝炎においては、以下の実施例で示すように、肝臓内のNKT細胞がOPNを産生していると考えられる。ここで産生されたOPNは、タンパク質分解酵素等により分解されOPNのフラグメントペプチドとなる。そして、OPN等がオートクライン的にNKT細胞を活性化させると、NKT細胞はIFN- $\gamma$ を産生する。このIFN- $\gamma$ については以下のような作用を有することが知られている（Hong F., et al., J. Clin. Invest. 2002 Nov;110(10):1503-13）。産生されたIFN- $\gamma$ は細胞膜に存在するサイトカインレセプターに結合すると、JAK-STATシグナル経路（Janus Kinase-signaling transducer and activator of transcription factor signaling pathway）が動く。すなわち、チロシンキナーゼであるJAKキナーゼ（Janus Kinase）が活性化し、活性化したJAKキナーゼは、レセプター細胞内領域のチロシン残基をリン酸化し、それに続いてサイトカイン誘導性転写活性化因子であるSTAT1（Signal Transducer and Activator of Transcription factor 1）を活性化させる。さらにこの活性化STAT1は、NKT細胞やCD4 $^{+}$ T細胞を活性化させる。

また、NKT細胞は活性化されるとIL-4を産生することが知られており（Kaneko Y., et al., J. Exp. Med., 2000, Jan 3;191(1):105-14）、このときI

L-4はオートクライン的にNKT細胞に作用し、その結果NKT細胞はFasリガンドを発現する。そしてNKT細胞は肝細胞に対してFas/FasL媒介細胞障害を引き起こすこととなる。

一方、上記OPN等によるNKT細胞の活性化によって、NKT細胞はMIP-2 (Macrophage inflammatory protein-2) を産生する。このMIP-2は好中球の遊走・集積を促すことが知られており (Xiao YQ., et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1997 Aug 22:1361(2):138-46.) 、その結果好中球が産生する活性酸素は肝細胞に対して障害を引き起こすこととなる（好中球媒介細胞障害）。

これに対し、本発明阻害剤ないし治療薬の有効成分であるOPN阻害抗体は、OPNまたはそのフラグメントペプチド部分に結合することにより、OPN等により活性化するマクロファージ、T細胞、NKT細胞、好中球等の免疫担当細胞の活性化を阻害することができる。

また、OPN阻害抗体が、上記のように免疫担当細胞を不活性化することに伴い、NKT細胞のIFN- $\gamma$ 産生、MIP-2産生、IL-4産生も阻害することができる。

そして、IFN- $\gamma$ の産生が阻害される結果、これにより活性化されるSTAT1や、このSTAT1により活性化されるNKT細胞やCD4 $^{+}$ T細胞の活性化も阻害することができる。

また、IL-4の産生が阻害される結果、これにより活性化されるNKT細胞の活性化を阻害し、それに続くFasリガンドの発現も阻害することができる。

従って、これらの活性化を阻害することにより、Fas/FasL媒介細胞障害を阻害することができる。

更に、OPN阻害抗体はMIP-2の産生を阻害する結果、好中球の遊走やMPOの産生を阻害することができ、それに続く好中球媒介細胞障害も阻害することができる。

そしてひいてはFas/FasL媒介細胞障害および好中球媒介細胞障害による肝細胞の壊死を抑制し、肝障害を軽減、治療することができる。

同様、喘息、関節炎、糖尿病、狼瘡、多発性硬化症、動脈硬化、肺線維症にお

いても、OPN阻害抗体で関連する免疫担当細胞の活性化を阻害することにより、これら疾患を治療することができるものである。

### 実施例

以下に、本発明の具体的な態様を実施例として示すが、本願は何らこれらに限定されるものではない。

#### 実 施 例 1

##### OPN阻害抗体の作製：

下に示すような、ヒトOPNの内部配列（V153からS169）に対応する合成ペプチド（2K1ペプチド）を用意し、免疫化に使用した。

2K1ペプチド：VDTYDGRGDSVVYGLRS（配列番号2）

この2K1ペプチドは、 $\alpha v \beta 3$ と $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンレセプターを認識するRGDとSVVYGL配列を有する。

この2K1ペプチドを、サイログロブリンと結合し、これを用い常法に従ってマウスを免疫化した。免疫化されたマウスの脾単球細胞と融合パートナー、X63-Ag8-653をポリエチレンギリコール仲介細胞融合に付し、文献（J. Immunol. 146:3721-3728）に述べた方法によりハイブリドーマを選択した。選択は、固定化されたGST/OPNaとCHO細胞から導いたOPN-aには反応するが、GSTには反応しないように見えるハイブリドーマを選ぶことにより行った。

2K1ペプチドで免疫したマウスから、2K1と名付けたモノクローナル抗体を得た。なお、モノクローナル抗体2K1を産生するハイブリドーマをHuman Osteopontin hybridoma 2K1と名付けて2001年6月20日付で、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）にFERM BP-7883として寄託した。

#### 試 験 例 1

OPNおよびそのトロンビン消化物（トロンビン切断型OPN）とOPN阻害抗体の反応性：

上記で得られた2K1抗体のOPNおよびそのトロンビン消化物に対する結合能をウエスタンプロット法を用いて試験した。2K1抗体はOPN-a、OPN-b、OPN-cおよびOPN-aのトロンビン消化物であるNハーフOPNと反応することがわかった。更に、この2K1抗体は、大腸菌から生産した非グリコシル化フォームの組換えOPNと結合するばかりでなく、CHO細胞から生産されたグリコシル化フォームの組換えOPN (J. Cell. Biochem. 77: 487-498, 2002) とも反応した。

## 実施例 2

### 肝炎モデルマウスへのOPN阻害抗体の投与：

肝炎におけるOPN阻害抗体の働きを明らかにするため、野生型マウスにCon Aを投与して人工的に作製した肝炎モデルマウスにOPN阻害抗体を投与し、その作用を確認した。

なお、本実施例はマウスの系で行うため、ヒトOPNに対する2K1抗体をそのまま用いることができない。そこでヒトOPNのSVVYGLR配列に相当するマウスOPNのSLAYGLR配列と、RGD配列とを有する下記のマウスオステオポンチンの内部配列 (C+V138からR153) に対応する合成ペプチド (M5ペプチド) を用意し、実施例1と同様にしてM5抗体を作製し、これを用いた。

M5ペプチド：CVDVVPNGRGDSLAYGLR (配列番号3)

一晩絶食させたBALB/cマウス (6週齢、雌) に、M5抗体をCon A投与3時間前に400μg/匹で静脈内投与した。コントロール群にはウサギIgGを同容量投与した。次いで、Con Aを300μg/匹で静脈内投与した。M5抗体投与2、6、12および24時間後に血清を採取し当該血清中のALT値の測定を行った。その結果を図1に示す。また、M5抗体あるいはコントロール抗体を投与した後、Con A投与後24時間のそれぞれの肝臓を採取し、HE染色を行った。その結果を図2に示した。HE染色の結果はNIH Imageで

定量解析し、肝炎組織の顕微鏡視野中（40倍）の壊死の細胞数の比率を算出した。その結果を図3に示した。

肝炎組織の顕微鏡視野中の壊死細胞数の比率（壊死率）は、M5抗体を投与した肝臓が10%程度であったのに対して、ウサギIgGを投与した肝臓は50%程度であった（図3）。一方、ALT値はM5抗体を投与した場合には1500程度であり、5000程度であったコントロールよりも低い値となった（図1）。この結果、M5抗体は肝炎による肝細胞の壊死を抑制することが判明した。

上記の通り、マウスOPNに対するM5抗体が肝細胞の壊死を抑制したことから、ヒトOPNに対する2K1抗体についても、ヒトの肝炎による肝細胞の壊死を抑制しうることが判明した。

### 実施例 3

#### 肝炎モデルマウスにおけるOPNの発現：

肝炎マウスマodelは、野生型マウスにConAを15mg/kgで尾静脈に投与することにより作製した。この肝炎モデルマウスの肝臓内でのOPN発現を、mOPN ELISA kit ((株)免疫生物研究所製)を用いたELISA法および抗オステオポンチン抗体((株)免疫生物研究所製)を用いたウエスタンプロット法を用いて解析した。ELISA法の結果を図4に示した。また、ウエスタンプロットの結果を図5に示した。

ELISA法の結果より、マウスにConAを投与することで肝臓中のOPN濃度が時間と共に増加していた。また、ウエスタンプロットの結果より、肝臓中にトロンビン切断型OPNの上昇が確認された。

### 実施例 4

#### 肝炎におけるOPNの機能の解析：

野生型マウスとOPN欠損マウス(OPN-/-) (Rittling SR., et al., Exp Nephrol, 1999, 7: 103-113)にそれぞれConAを200μg/匹で投与した後、実施例2と同様に血清中のALT値測定を行った。また、ConAを400μg/匹投与してからの生存率を比較した。ALT値測定の結果を図6に示

した。また、生存率の結果を図7に示した。

ALT値測定の結果より、OPN欠損マウスでは、野生型マウスと比べてALT値が減少していた。また、OPN欠損マウスでは生存率も上昇していた。

### 実施例 5

#### 肝臓内におけるOPNとその受容体の產生細胞の解析：

##### (1) 肝浸潤白血球の調製

300 µg のConAを尾静脈内投与し作製した肝炎モデルマウスの肝臓を(6時間)取りだした後、ホモジナイズし、メッシュを通した。次いでこれを、PBSにて洗浄後、肝細胞を取り除くため、ヘパリン(100U/ml)を含む3%のPercollに加え、2,000回転で15分間処理して細胞ペレットを調製した。得られた細胞ペレットを赤血球溶血用緩衝液(以下、「HLB液」という)((株)免疫生物研究所製)で処理することにより、赤血球を溶血させた。更に、これらをPBSで3回洗浄した後、D-MEM/10%FCSに加えて肝浸潤白血球を調製した。

##### (2) 肝浸潤白血球を用いた細胞内OPNの検出

肝臓内においてOPNが、NKT細胞またはT細胞のどちらの細胞から產生しているのかを確認するため、細胞内サイトカイン染色および細胞培養上清からのELISA法による測定をそれぞれ以下の手順で行った。

まず、上記(1)で調製した肝浸潤白血球は、モネンシン(monensin)存在下で90分培養し、抗NKG1.1抗体と抗TCR $\beta$ 抗体(ともにPharMingen製)で細胞表面分子を染色した。次に、4%のパラホルムアルデヒドで10分間固定し、サポニンバッファー(1%FCS、0.1%サポニン、0.1%NaN<sub>3</sub>を含むPBS溶液)で膜透過処理を行った。更に、ビオチン化したOPN阻害抗体((株)免疫生物研究所製)を加え、ストレプトアビジン-APC(ジャクソン製)を二次抗体として使用し、FACSCyberline(FACScaliber:BD製)にて解析した。

また、細胞培養上清からのELISAはmOPN EIA kit((株)免疫生物研究所製)を用いて行った。

肝炎モデルマウスの細胞内サイトカイン染色の結果を図8に示した。また、細胞培養上清のELISA法による測定結果を図9に示した。

細胞内サイトカイン染色により、NK1.1<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup>であるNKT細胞集団の細胞内にOPNの発現が確認された。また、細胞培養上清中におけるOPN量のELISA測定により、NK1.1<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup>であるNKT細胞集団においてOPN発現は検出されたが、NK1.1<sup>-</sup>TCR<sup>+</sup>であるT細胞集団においてOPN発現は検出されなかった。

従って、肝臓内におけるOPN産生細胞は主にNKT細胞であることが示唆された。

### (3) 肝炎発症に関わるOPN受容体およびMIP-2の解析

肝炎モデルマウスの肝臓内のNKT細胞およびT細胞から、 $\alpha$ 4インテグリン、 $\alpha$ 9インテグリンおよびMIP-2が発現されているかどうかを、NKT細胞およびT細胞からそれぞれ抽出したRNAを用いたRT-PCRで確認した。その結果を図10に示した。G3PDHはコントロールとして使用した。以下にRT-PCRに利用したプライマーとその配列を示した（配列番号4～11）。

G3PDH :

5'-ACCAACAGTCCATGCCATCAC-3' (センス)

5'-TCCACCAACCCTGTTGCTGTA-3' (アンチセンス)

$\alpha$ 4インテグリン :

5'-TGGAAAGCTACTTAGGCTACT-3' (センス)

5'-TCCCACGACTTCGGTAGTAT-3' (アンチセンス)

$\alpha$ 9インテグリン :

5'-AAAGGCTGCAGCTGTCCCCACATGGACGAAG-3'

(センス)

5'-TTTAGAGAGATATTCTTCACAGCCCCAAA-3'

(アンチセンス)

MIP-2 :

5'-GAACAAAGGCAAGGCTAACGTGA-3' (センス)

5'-AACATAACAAACATCTGGGCAAT-3' (アンチセンス)

図10より、 $\alpha 9$ インテグリンおよびM1P-2はNKT細胞に発現しているが、T細胞には発現していなかった。一方、 $\alpha 4$ インテグリンはNKT細胞およびT細胞の両方に発現していた。

## 実施例 6

### OPNのトロンビン消化物に対する細胞遊走試験：

#### (1) 細胞遊走試験

肝浸潤白血球のOPNのトロンビン消化物に対する細胞遊走試験を行った。まず、実施例5で調製した肝炎モデルマウスの肝浸潤白血球の $10 \mu g/ml$ に、それぞれ全長OPN(rOPN：非切断型OPN)を $10 \mu g/ml$ 、トロンビン(Thr)を $1U/ml$ 、OPNのトロンビン消化物(Thr-OPN)を $10 \mu g/ml$ を添加し、 $37^{\circ}C$ で2時間培養した後、細胞遊走効果をケモタキシスチャンバー(ポアサイズ $5 \mu m$ の24穴Transwell tissue culture plate(Costar製))を用いて行った。また、野生型マウスから得られた肝浸潤白血球についても同様の細胞遊走試験を行った。それらの結果を図11に示した。

細胞遊走試験の結果、肝炎モデルマウスから得られた細胞は、OPNのトロンビン消化物に対する遊走効果が認められたが、全長OPN(非切断型OPN)に対する遊走効果はほとんど認められなかった。一方、野生型マウスから採取した細胞は、いずれのOPNにも反応性を示さなかった。次に、どの受容体が細胞遊走に関わっているかを、抗体を用いた阻害試験によって同定した。

#### (2) 細胞遊走阻害試験

肝炎モデルマウスから得られた細胞の、OPNのトロンビン消化物(Thr-OPN) $10 \mu g/ml$ に対する細胞遊走効果を、実施例2で得られたM5抗体、M1抗体(O-17)(（株）免疫生物研究所製)、抗インテグリン $\beta 1$ (HM $\beta 1$ )抗体、抗 $\beta 3$ (HM $\beta 3$ )抗体、抗 $\alpha v$ (RMV-7)抗体および抗 $\alpha 4$ (R1-2)抗体(何れもPharmingen製)の $100 \mu g/ml$ で阻害した。その結果を図12に示した。

阻害試験の結果、肝炎モデルマウスから得られた細胞のOPNのトロンビン消化物（Thr-OPN）に対する細胞遊走はM5抗体により阻害された。また、抗インテグリン $\beta$ 1抗体と抗 $\alpha$ 4インテグリン抗体も細胞遊走を阻害した。

### 実施例 7

#### CD4<sup>+</sup>T細胞活性化阻害試験：

実施例2で得られたM5抗体を用いてCD4<sup>+</sup>T細胞活性化阻害試験を行った。肝浸潤活性化CD4<sup>+</sup>T細胞の数を、PE標識CD4（L3T4：PharMingen製）抗体とFITC標識CD69抗体（PharMingen製）を用い、FACScaliber（FACScaliber：BD製）にて解析した（以下、「FACScaliber」）。また、比較としてコントロール抗体（正常ウサギIgG）を用いて同様に試験を行った。それらの結果を図13に示した。また、それらの解析結果から活性化CD4<sup>+</sup>T細胞数を算出したものを図14に示した。

肝浸潤活性化CD4<sup>+</sup>T細胞の数を解析した結果、M5抗体投与により肝臓中の活性化CD4<sup>+</sup>T細胞の割合の減少および細胞数の減少が認められた。

### 実施例 8

#### ConA投与後の肝臓内浸潤細胞の解析：

##### (1) 好中球、CD4<sup>+</sup>T細胞、マクロファージ数の算出

野生型マウスとOPN欠損マウスにそれぞれConAを投与してから6時間後の肝臓内浸潤細胞中の好中球、CD4<sup>+</sup>T細胞、マクロファージ数を、FACScaliberにて算出した。Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、F4/80<sup>+</sup>画分をそれぞれ好中球、CD4<sup>+</sup>T細胞、マクロファージ画分とした。Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>およびCD4<sup>+</sup>、F4/80<sup>+</sup>の染色は以下のようにして行った。ConA投与後、6時間の肝臓から浸潤白血球を精製し、ビオチン化CD4（L3T4）抗体、Gr1（RB6-8C5）抗体（共にPharMingen製）、ビオチン化F4/80抗体（Caltag laboratories製）で反応させ、ストレプトアビシン-FITC（DAKO製）で検出した。FACScaliber解析の結果から

算出された各マウスにおけるそれぞれの好中球、CD4<sup>+</sup>T細胞、マクロファージ数を図15に示した。

FACS解析の結果、野生型マウスにおいて好中球が他の細胞と比較して非常に多いことが確認された。また、OPN欠損マウスでは好中球の欠損が確認された。

#### (2) MPO(ミエロペルオキシダーゼ)抗体による肝炎組織における好中球の発現の解析

肝炎モデルマウスから得られた肝組織をパラフィン包埋した後、5 μmに薄切りし、内因性ペルオキシダーゼ処理を行った。次いでこの薄片に1次抗体として抗MPO抗体(DAKO製)を4℃一晩反応させた。次に、二次抗体としてENVISION(DAKO製)を反応させ、免疫染色を行った。

この免疫染色の結果を図16に示した。

その結果、壊死した肝細胞内に好中球の集積がみられ、肝炎発症と好中球遊走の関与が確認された。

### 実施例 9

#### 肝炎モデルマウスにおけるOPNのトロンビン消化物の機能の解析：

##### (1) 好中球のMPO活性に種々のOPNが与える影響

12%カゼインナトリウム溶液をマウス腹腔内投与し6時間後に腹腔内から採取した好中球を種々のGST融合OPN蛋白質20 μg/mlで刺激した。

全長マウスOPN(L17-N294)はトロンビンによってR154とS155で切断され、N末端側のNハーフOPN(L17-R154)とC末端側のCハーフOPN(S155-N294)となるので、これらをGST融合タンパク質となるように次に示す方法にて作製した。なお、NハーフOPNとCハーフOPNは、マウス腎臓cDNAから次のプライマー(配列番号12~15)を用いてPCRによりクローニングした。

全長マウスOPN：

5'-TAGGGATCCCTCCCGGTGAAAGTGACTGAT-3'

(センス)

5' - G T C T C G A G T T A G T T G A C C T C A G A A G A T G A - 3'

(アンチセンス)

NハーフOPN:

全長OPNフォワードプライマー

(センス)

5' - A A C C T C G A G T T A C C T C A G T C C A T A A G C C A A - 3'

(アンチセンス)

CハーフOPN

5' - C A G G G A T C C T C A A A G T C T A G G A G T T T C C A G - 3'

(センス)

全長マウスマウスOPNリバースプライマー

(アンチセンス)

上記のプライマーを用いて得られるPCR産物は、BamHIとXholで制限酵素消化後、pGEX6P-1ベクター(Amersham製)に導入し、ABI 310 Genetic Analyzer automatic sequencer (Applied Biosystems製)を用いて配列を確認した。次に、この配列を大腸菌JM109に導入して大腸菌を形質転換後、GST融合OPN蛋白質を常法により精製した。

20 μg/mlの上記GST融合OPN蛋白質で好中球を36時間刺激した培養上清からMPO(ミエロペルオキシダーゼ)活性を測定した。MPO活性は、50 μlの培養上清と100 μlの3',5',5'-tetramethylbenzidine liquid substrate system (Sigma製)とを混和し、37°Cで30分加温し、450 nmの吸光度を測定することにより定量化した。その結果を図17に示した。図中の全ての値はコントロールGSTで測定されたMPO活性で差し引いた値である。

本結果から、NハーフOPNがMPO活性を上昇させることが確認された。

(2) 好中球の肝臓内への浸潤のFACS解析

M5抗体投与の有無でのConA投与6時間後の肝臓内浸潤好中球を測定した。ConA投与肝臓から白血球を採取し、Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞をFACS解析した。また、比較としてコントロール抗体（正常ウサギIgG）を用いて同様に解析を行った。それらの結果を図18に示した。

FACS解析の結果、M5抗体投与により、好中球の肝臓内への浸潤が抑制されることが確認された。

### (3) 肝臓中MIP-2値の測定

野生型マウスにConAを投与した後、6、12、24時間後の肝臓中におけるMIP-2値をMIP-2 EIA kit ((株)免疫生物研究所製)を用いて測定した。また、比較としてコントロール抗体（正常ウサギIgG）を用いて同様に測定を行った。それらの結果を図19に示した。

肝臓中MIP-2値の測定の結果、M5抗体投与によりMIP-2の発現が減少していることが確認された。

### (4) 肝臓内におけるOPN受容体α4、α9インテグリンの発現の解析

α4インテグリンとα9インテグリンの発現を実施例5と同様のプライマーを用いたリアルタイムPCRで測定した。測定した値はG3PDHにて補正することにより定量化した。また、比較としてコントロール抗体（正常ウサギIgG）を用いて同様に解析を行った。それらの結果を図20に示した。

肝臓内におけるOPN受容体α4、α9インテグリンの発現解析の結果、α4、α9インテグリンmRNAは、M5抗体投与により減少していることが確認された。これは肝臓内にα4、α9インテグリンを発現する細胞の浸潤が抑制されていることを示唆する結果であった。

## 実施例 10

### 肝臓中のサイトカイン濃度の測定：

#### (1) 肝臓中IFN-γ発現細胞の解析

ConA投与マウスから分離したNKT細胞とT細胞の培養上清中のIFN-γをIFN-γ EIA kit (Pharmingen製)を用いて測定した。その結果を図21に示した。

肝臓中 INF- $\gamma$  発現細胞の解析の結果、INF- $\gamma$  は、主に NKT 細胞から产生していることが確認された。

#### (2) 肝臓中 INF- $\gamma$ 量の測定

M5 抗体を投与した Con A 肝炎マウスと、コントロール抗体を投与した Con A 肝炎マウスにおける肝臓中の INF- $\gamma$  発現量を INF- $\gamma$  EIA kit (Pharmingen 製) を用いて定量した。それらの結果を図 22 に示した。

肝臓中 INF- $\gamma$  量の測定の結果、M5 抗体の投与により、コントロールの抗体を投与した場合よりも、INF- $\gamma$  量が有意に減少していることが確認された。

以上のことから NKT 細胞が產生する OPN がオートクライインで NKT 細胞に働いて NKT 細胞を活性化させていると考えられた。OPN を抗体にて阻害することで INF- $\gamma$  產生が低下したことから、OPN が NKT 細胞活性化に重要な役割をしていることが示唆された。

#### 実施例 11

##### OPN 阻害抗体の投与時期の検討：

OPN 阻害抗体の投与時期を検討するために、M5 抗体の 400  $\mu$ g を Con A を投与する 3 時間前と Con A の投与と同時に各マウスに投与し、ALT 値を測定した。その結果を図 23 に示した。

ALT 値の測定の結果、Con A の投与 3 時間前に M5 抗体を投与した場合には特に優れた肝炎抑制効果が認められた。一方、Con A の投与と同時に M5 抗体を投与した場合であっても、肝炎抑制効果が認められた。

上記の通り、Con A を投与して発生するマウスの肝炎において NKT 細胞が主要な OPN 產生細胞であることが判明した。そして OPN 阻害抗体を投与することにより、INF- $\gamma$  および MIP-2 の產生が阻害され、その結果、NKT 細胞の活性化を阻害できることが判明した。また、NKT 細胞の活性化を阻害できることから、IL-4 の產生も阻害することができると考えられる。更に、前記活性化に関連する CD4 $^+$  T 細胞および好中球の活性化の阻害や、また更にこ

これらの活性化に関連する Fas / FasL 媒介細胞障害および好中球媒介細胞障害も阻害できることが判明した。

従って、上記の活性化を阻害することにより、これら免疫担当細胞の活性化を原因とする疾患の治療できることが判明した。

このようにマウスの OPN 阻害抗体 (M5 抗体) が NKT 細胞活性化、CD4<sup>+</sup>T 細胞活性化、好中球活性等の阻害効果を示し、免疫担当細胞の活性化を原因とする疾患を治療できることから、ヒトOPN 阻害抗体 (2K1 抗体) についても、同様に疾患を治療しうることが示唆された。

#### 産業上の利用可能性

本発明の免疫担当細胞活性化阻害剤は、免疫担当細胞の活性化を阻害するものである。

従って、上記阻害剤を有効成分としてすることで免疫担当細胞の活性化を原因とする疾患の治療薬として有用である。

### 請求の範囲

1. オステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する抗体を含有する免疫担当細胞活性化阻害剤。
2. オステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する抗体が、RGD配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害し、かつ SVVYGLR配列を認識するインテグリンとオステオポンチンまたはそのフラグメントとの結合を阻害する抗体である請求項第1項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。
3. オステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分が、オステオポンチンのN末端フラグメントである請求項第1項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。
4. オステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分が、次の(A)で示されるペプチドを含むペプチドである請求項第1項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。  
(A) RGDSVVYGLR
5. オステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分が、次の(B)で示されるペプチドを含むペプチドである請求項第1項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。  
(B) VDTYDGREGDSVVYGLRS
6. 免疫担当細胞が、NKT細胞である請求項第1項ないし第5項の何れかの項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。
7. NKT細胞のINF- $\gamma$ 産生を阻害するものである請求項第6項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

8. NKT細胞のMIP-2産生を阻害するものである請求項第6項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

9. NKT細胞のIL-4産生を阻害するものである請求項第6項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

10. 免疫担当細胞が、好中球である請求項第1項ないし第5項の何れかの項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

11. 免疫担当細胞が、T細胞である請求項第1項ないし第5項の何れかの項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

12. T細胞が、CD4<sup>+</sup>T細胞である請求項第11項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

13. Fas/FasL媒介細胞障害を阻害するものである請求項第1項ないし第12項の何れかの項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

14. 好中球媒介細胞障害を阻害するものである請求項第1項ないし第12項の何れかの項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤。

15. 請求項第1項ないし第14項の何れかの項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤を有効成分とする免疫担当細胞の活性化を原因とする疾患の治療薬。

16. 免疫担当細胞が、NKT細胞、好中球、T細胞から選ばれる免疫担当細胞の1種以上である請求項第15項記載の疾患の治療薬。

17. 免疫担当細胞の活性化を原因とする疾患が、肝炎、喘息、関節炎、糖尿病

、狼瘡、多発性硬化症、動脈硬化、肺線維症から選ばれる疾患である請求項第15項または第16項記載の疾患の治療薬。

18. 請求項第1項ないし第14項の何れかの項記載の免疫担当細胞活性化阻害剤を有効成分とする肝障害の治療薬。

19. 肝障害が、ウイルス性肝炎または薬物性肝炎である請求項第18項記載の肝障害の治療薬。

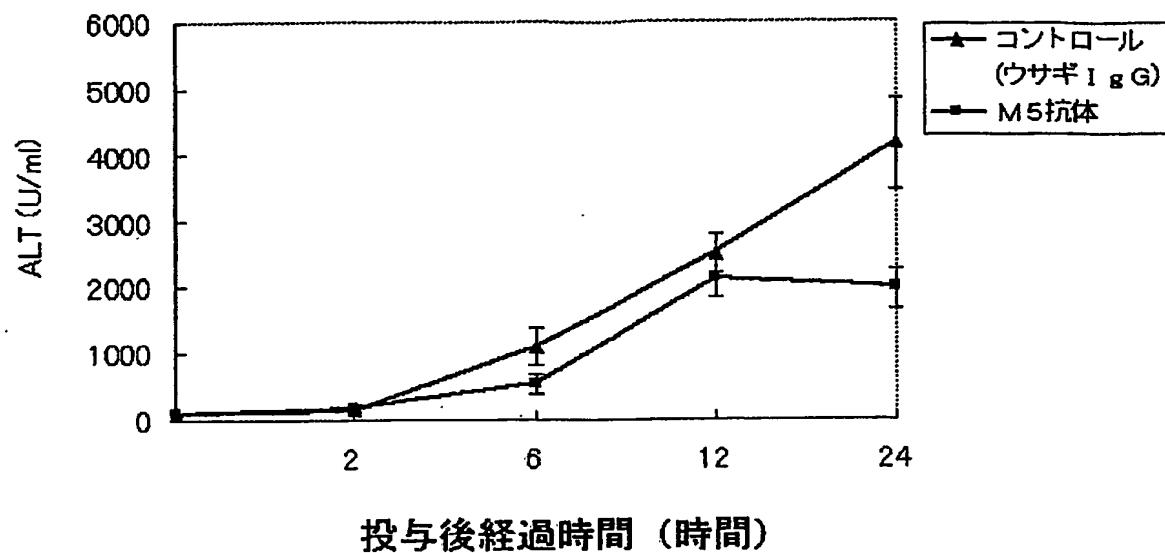
20. 肝障害が、自己免疫性肝炎である請求項第18項記載の肝障害の治療薬。

21. 肝細胞の壊死を抑制するものである請求項第18項ないし第20項の何れかの項記載の肝障害の治療薬。

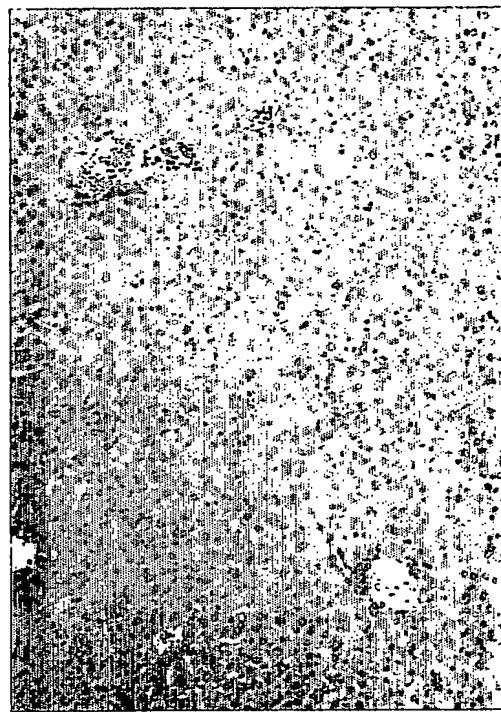
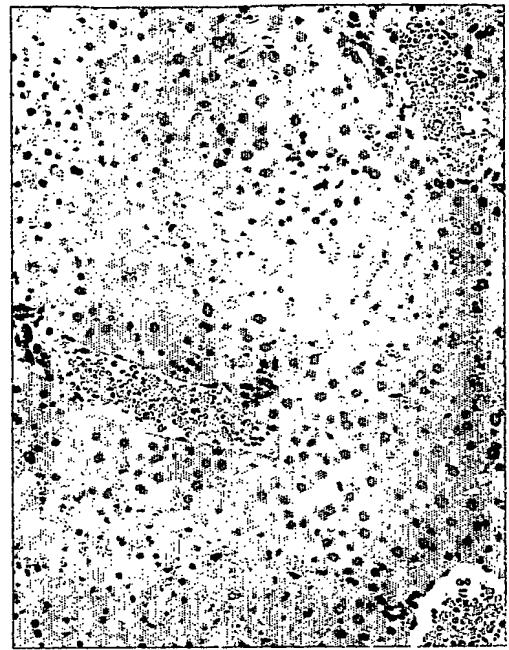
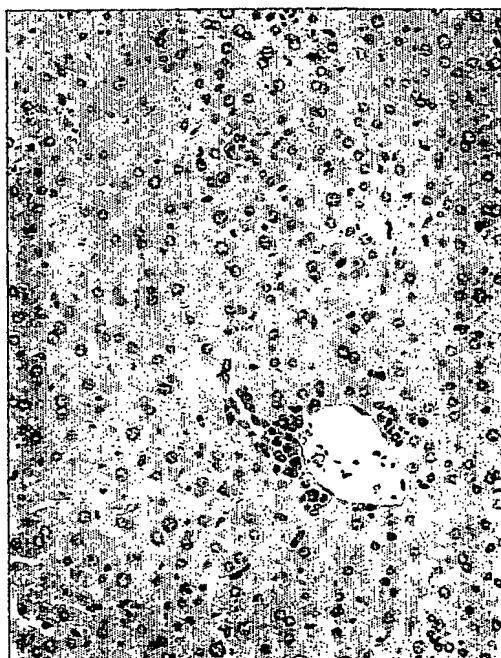
22. 免疫担当細胞の活性化を原因とする疾患の患者に、請求項第15項ないし第17項の何れかの項記載の治療薬を投与することを特徴とする当該疾患の治疗方法。

23. 肝障害患者に、請求項第18項ないし第21項の何れかの項記載の肝障害の治療薬を投与することを特徴とする肝障害の治疗方法。

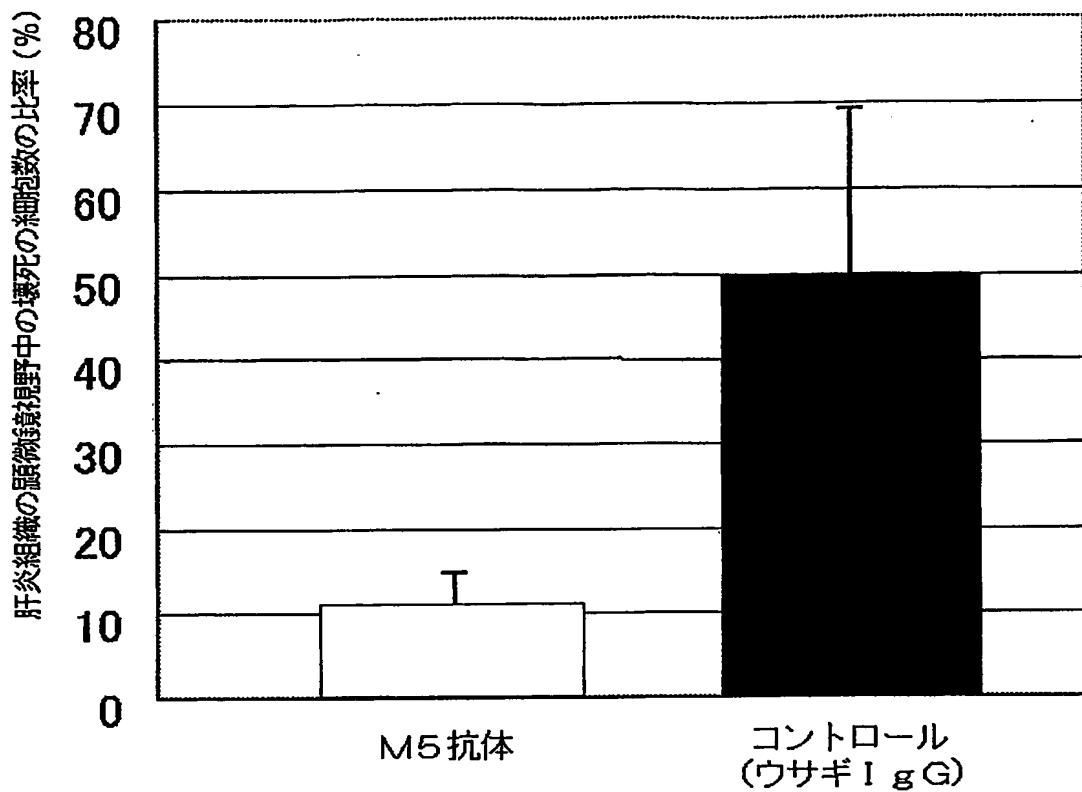
第1図



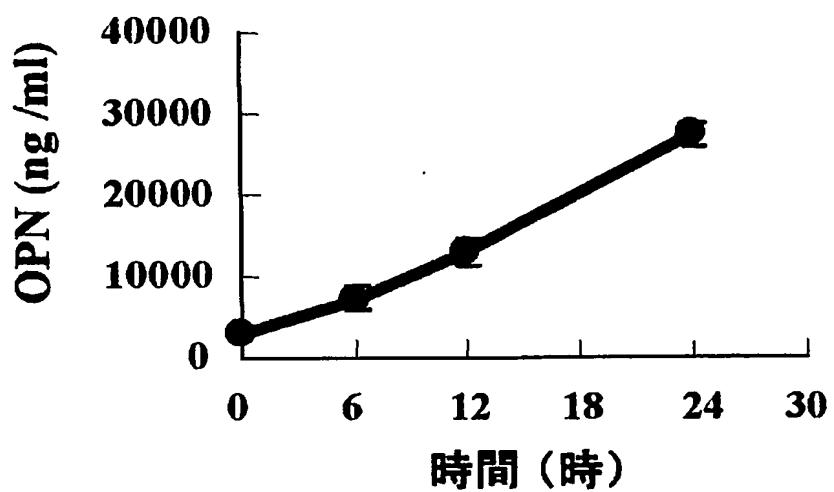
第 2 図



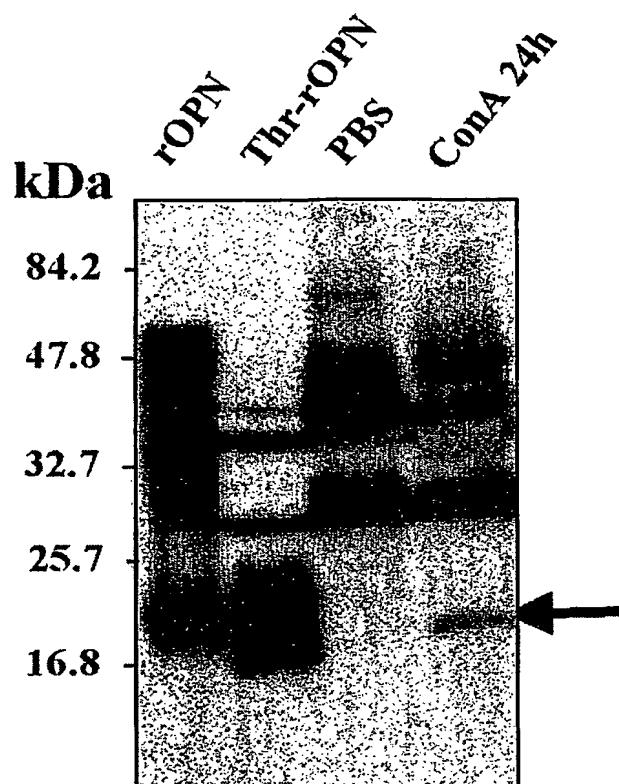
第3図



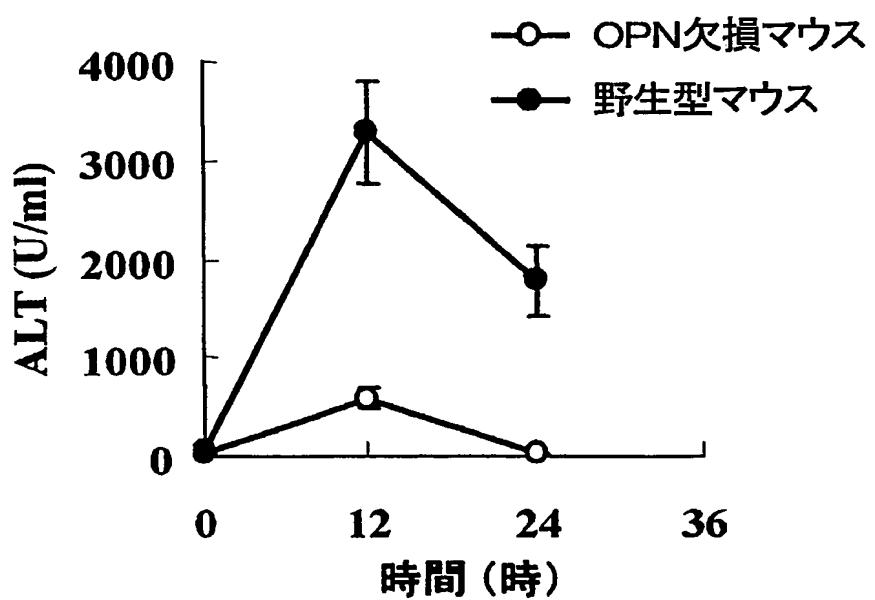
第4図



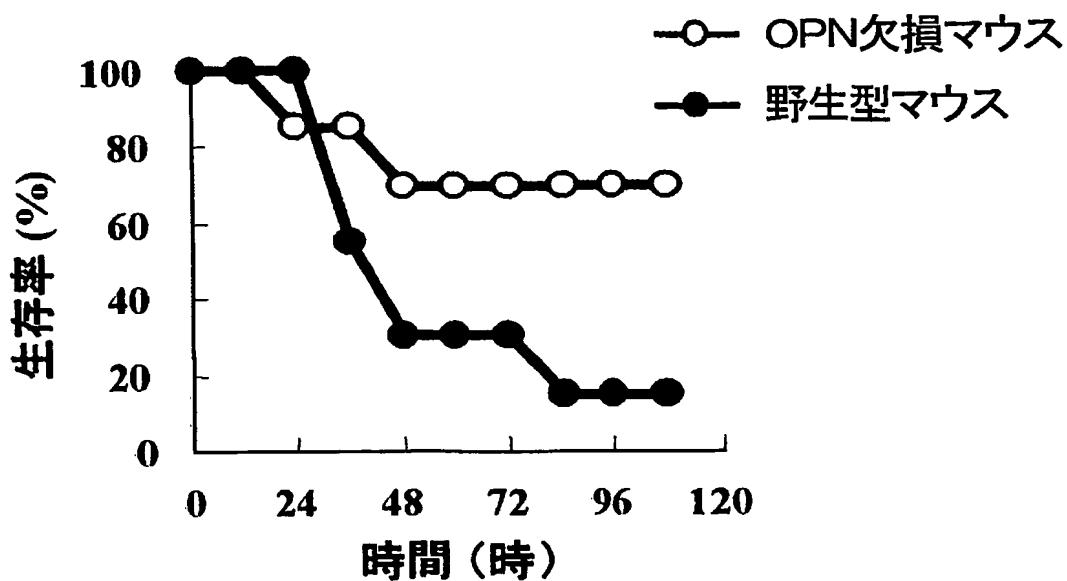
第 5 図



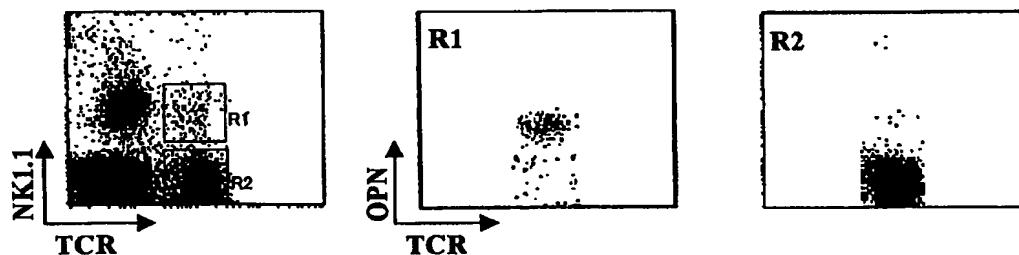
第 6 図



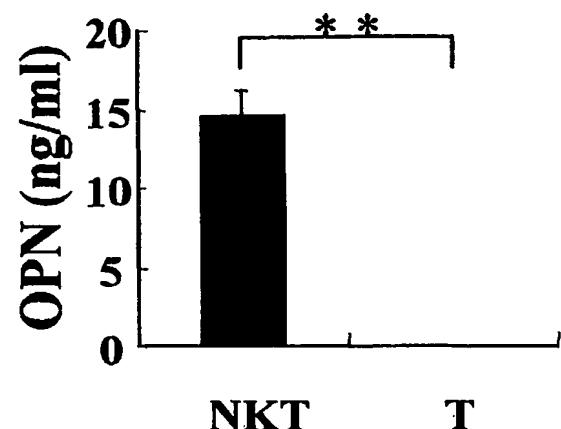
第 7 図



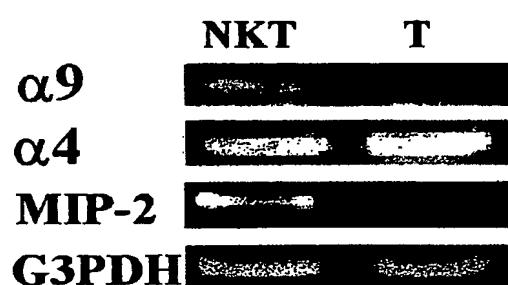
第 8 図



第 9 図



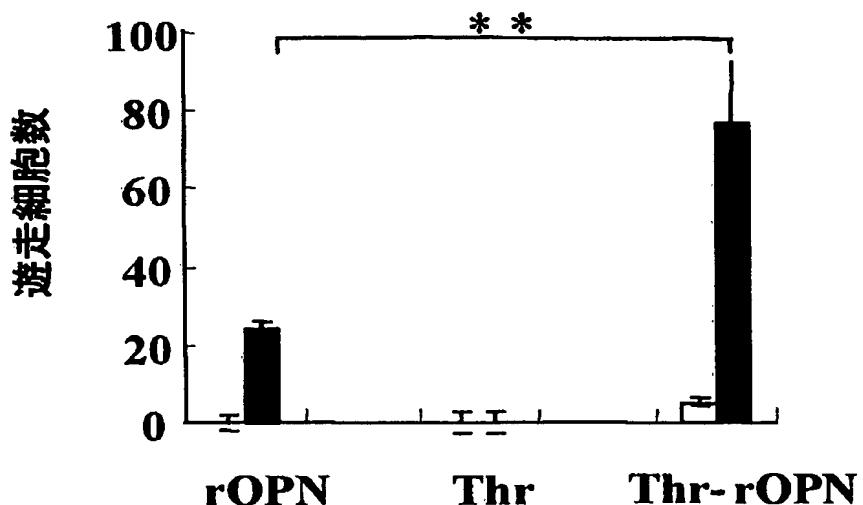
第 10 図



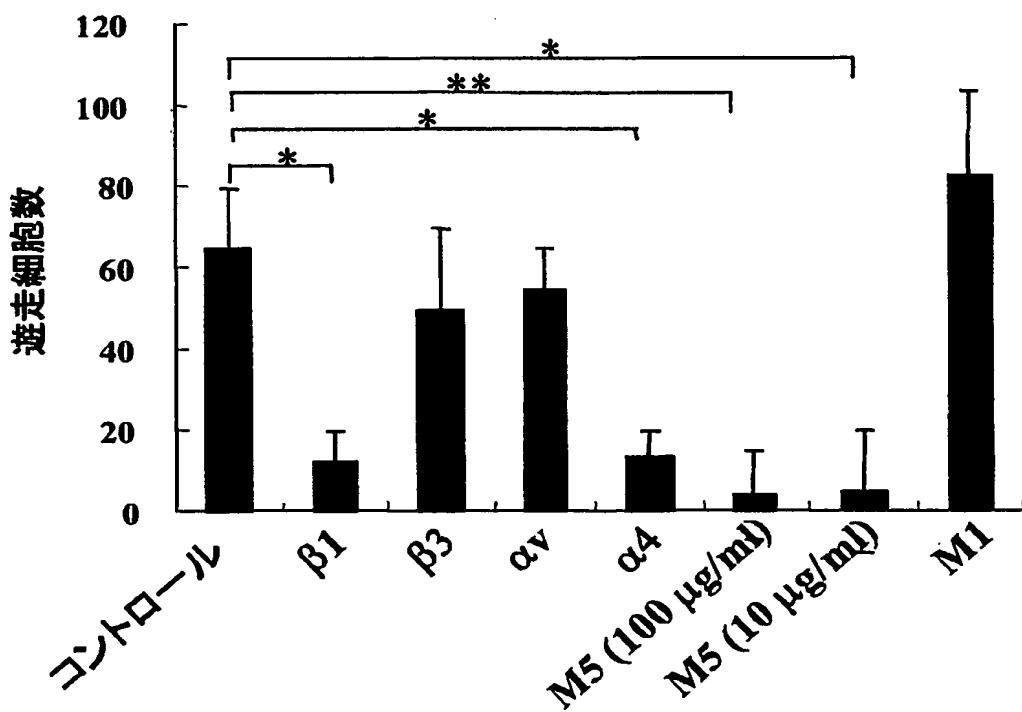
第 11 図

## □ 野生型マウス

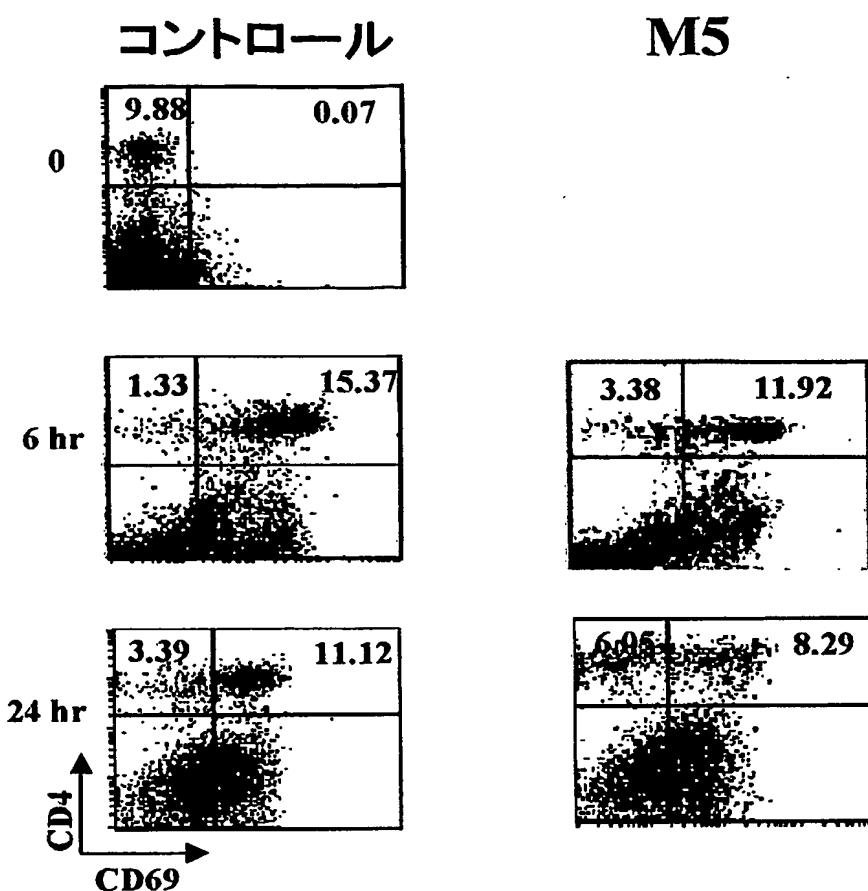
## ■肝炎モデルマウス



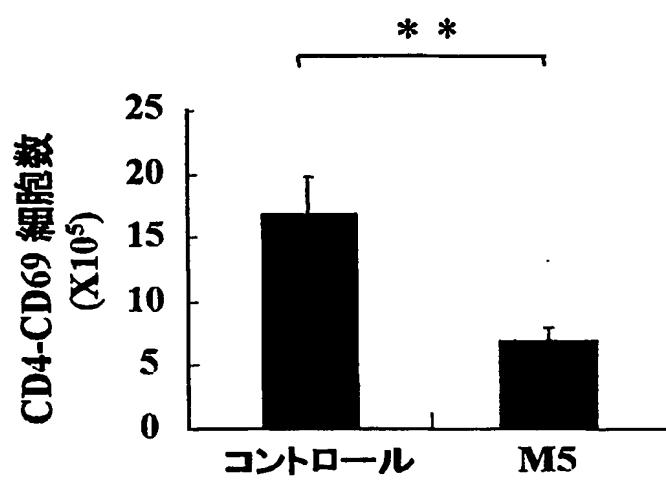
第12図



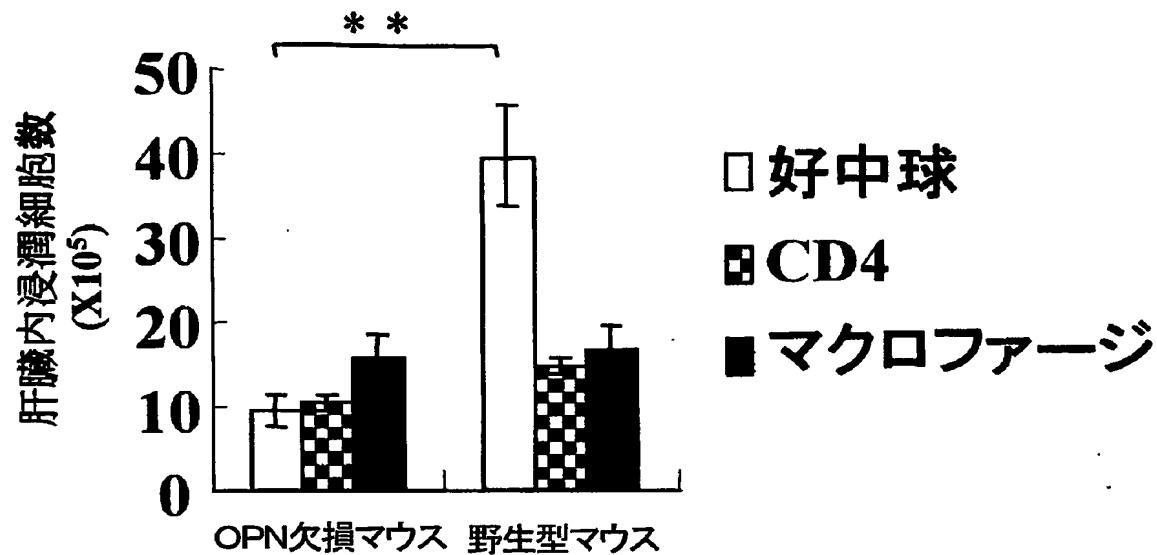
第13図



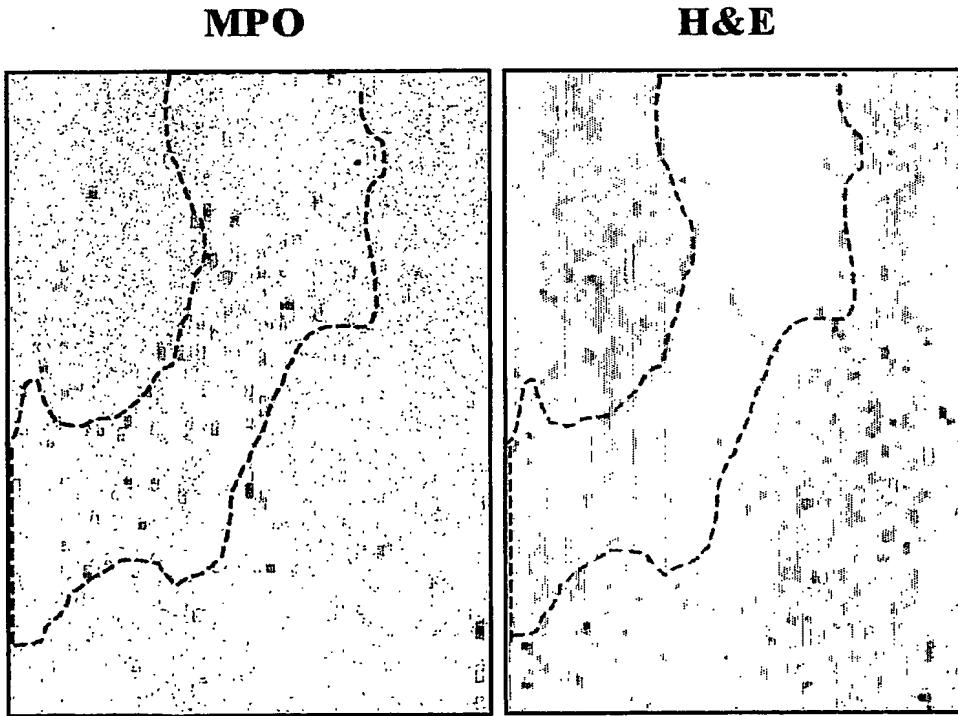
第14図



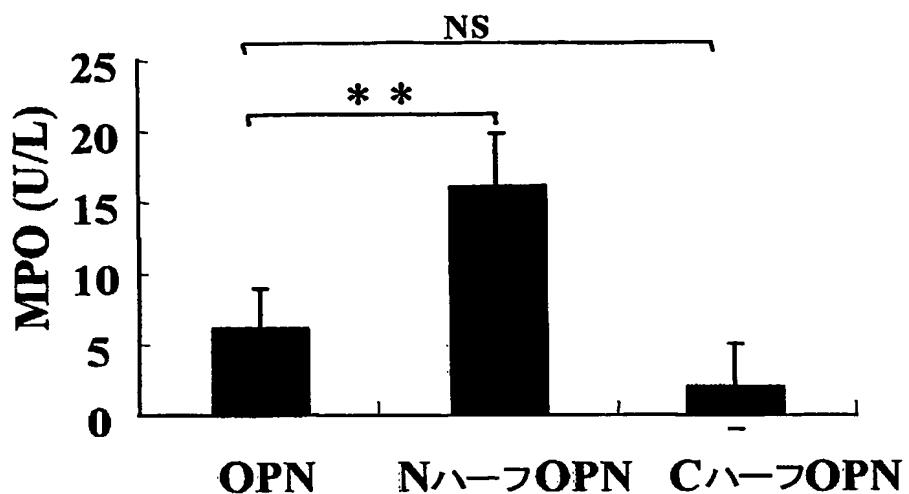
第 15 図



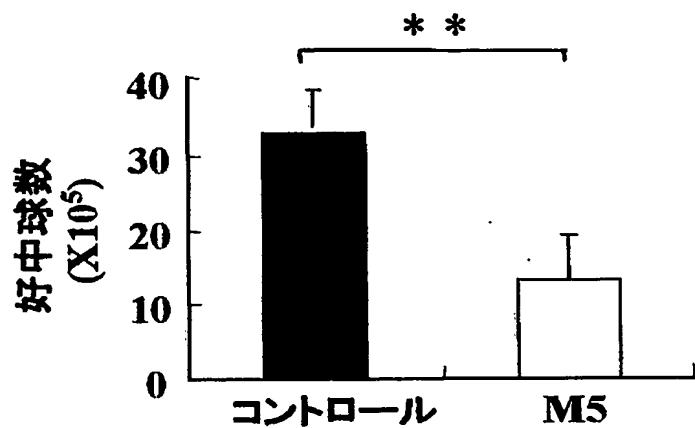
第 16 図



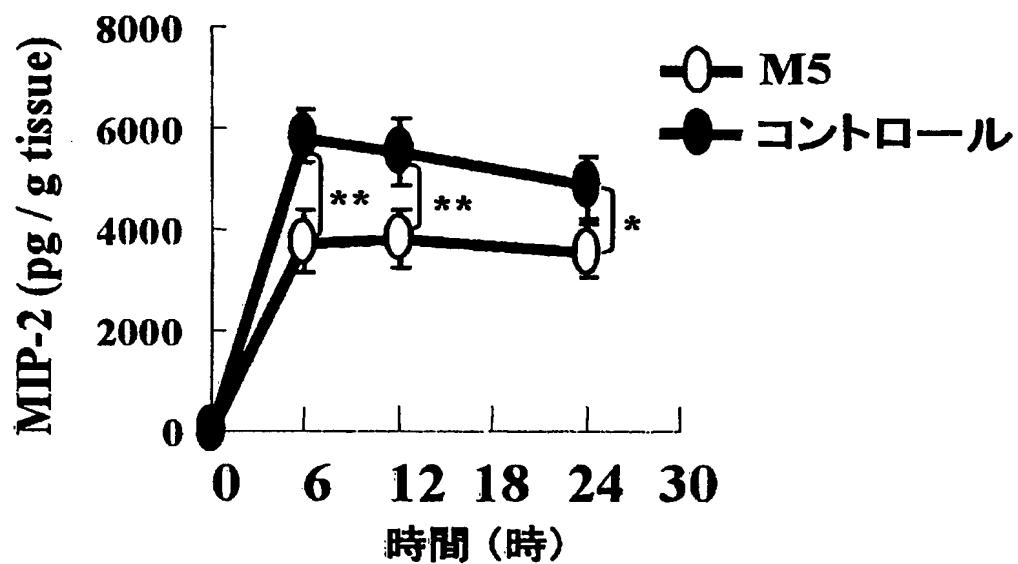
第 1 7 図



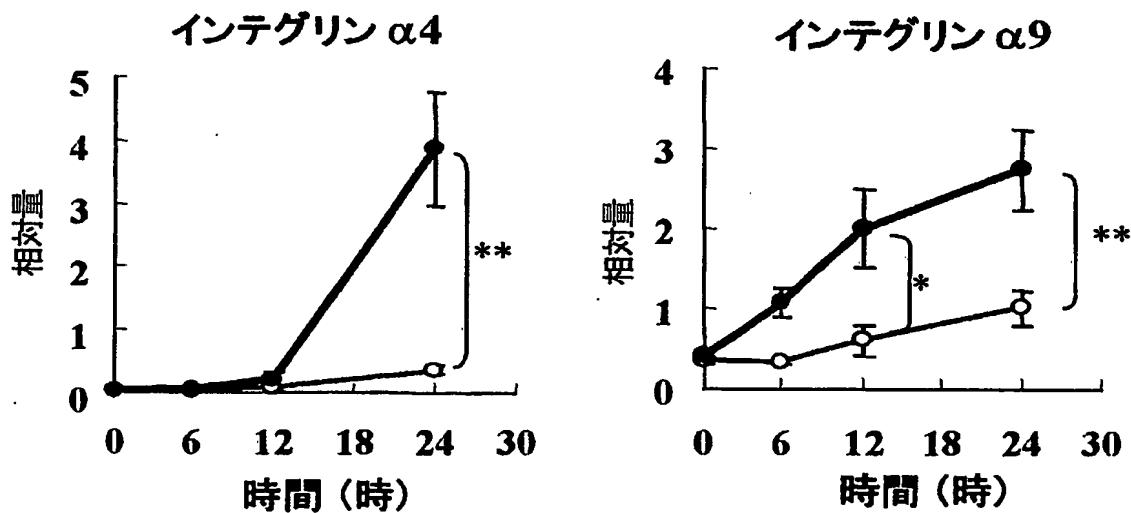
第 1 8 図



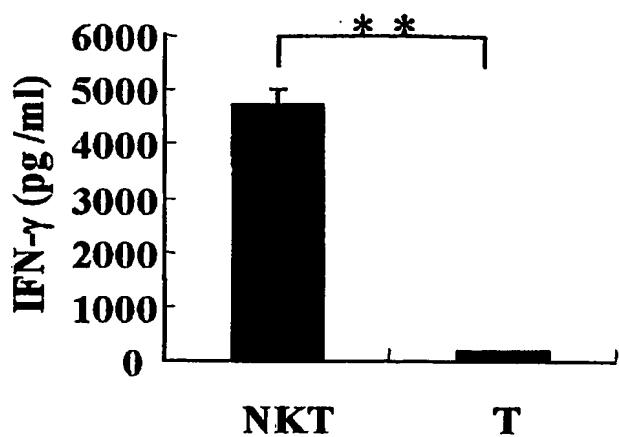
第 19 図



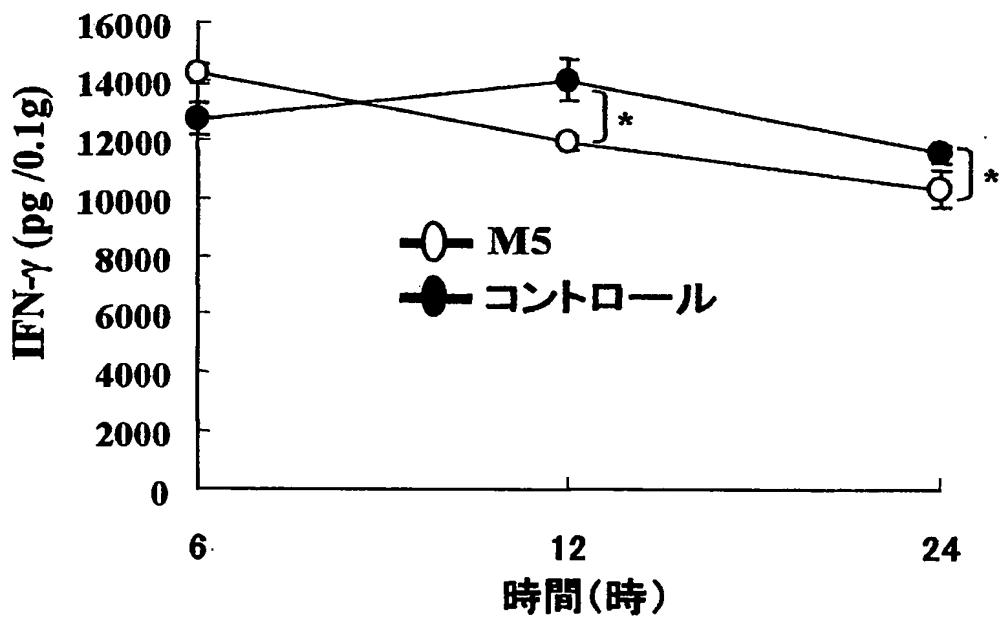
第 20 図



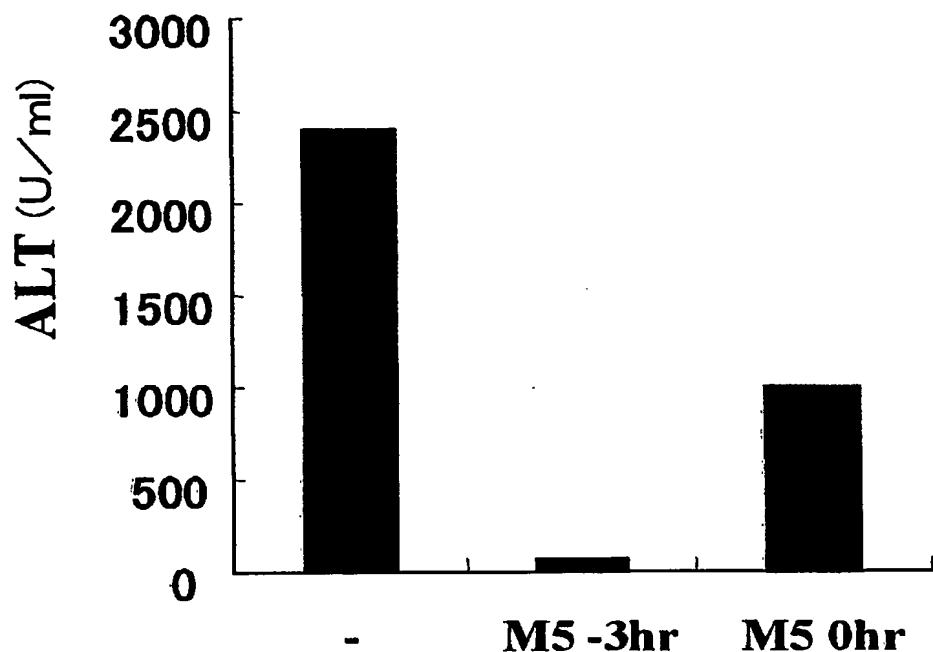
第 2 1 図



第 2 2 図



第 2 3 図



## SEQUENCE LISTING

<110> Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.  
G-in Techno Science Co., Ltd.

<120> Immunocompetent cell activation inhibitor and use thereof

<130> PF-040006-W0

<150> JP 2003-146188

<151> 2003-05-23

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:fragment peptide

<400> 1

Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg  
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:2k1 peptide

<400> 2

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg  
1 5 10 15

Ser

<210> 3  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:M5 peptide

<400> 3

Cys Val Asp Val Pro Asn Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu  
1 5 10 15

Arg

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 4  
accacagtcc atgccatcac 20

<210> 5  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 5  
tccaccaccc ctgttgctgt a 21

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 6  
tggaagctac ttaggctact 20

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 7  
tcccacgact tcggtagtat 20

<210> 8  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 8  
aaaggctgca gctgtcccac atggacgaag 30

<210> 9  
<211> 30  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 9

tttagagaga tattttcac agccccaaa

30

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 10

gaacaaaggc aaggcttaact ga

22

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 11

aacataacaa catctggca at

22

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 12

taggatccc tcccggtcaa agtgactgat

30

<210> 13  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 13  
gtctcgagtt agttgaccc agaagatga

29

<210> 14  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 14  
aacctcgagt tacctcagtc cataagccaa

30

<210> 15  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 15  
cagggtatcct caaagtctag gagtttccag

30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007321

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K39/395, A61P37/06, 1/16, 11/06, 19/02, 3/10, 9/10, 11/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/81522 A1 (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.), 17 October, 2002 (17.10.02), Claims; examples (Family: none)	1-21
X	WO 03/27151 A1 (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.), 03 April, 2003 (03.04.03), Claims; examples (Family: none)	1-21
X	WO 00/63241 A2 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORP.), 26 October, 2000 (26.10.00), Claims; examples; page 53 & EP 1175223 A1 & JP 2003-517284 A	1-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
03 August, 2004 (03.08.04)Date of mailing of the international search report  
24 August, 2004 (24.08.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007321

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Michinari HARADA et al., "V $\alpha$ 14NKT Saibo ni Yoru Shizen Men'ekikei to Kakutoku Men'ekikei no Seigyo", Protein, Nucleic acid and Enzyme, 2002, Vol.47, No.16, pages 2109 to 2116	6-9,16
A	Kazunori KATO, "Men'eki Shikkan o Meguru Kisoteki Kenkyu no Shinpo killer Saibo no Saibo Shogai Kiko", Bessatsu · Igaku no Ayumi Men'eki Shikkan, Ishiyaku Pub., Inc., 1995, pages 48 to 50	13
A	Junko MORIMOTO et al., "Osteopontin to Men'eki Seigyo", Annual Review Men'eki 2002, Kabushiki Kaisha Chugai Igakusha, 2001, pages 151 to 157	1-21

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No. PCT/JP2004/007321
--

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
  - a. type of material
    - a sequence listing
    - table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material
    - in written format
    - in computer readable form
  - c. time of filing/furnishing
    - contained in the international application as filed
    - filed together with the international application in computer readable form
    - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/JP2004/007321**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 22, 33  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 22 and 23 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2) (a) (i) and Rule 39.1(iv), to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A61K39/395,  
A61P37/06, 1/16, 11/06, 19/02, 3/10, 9/10, 11/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/81522 A1 (株式会社免疫生物研究所) 2002. 10. 17, 請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-21
X	WO 03/27151 A1 (株式会社免疫生物研究所) 2003. 04. 03, 請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-21
X	WO 00/63241 A2 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 2000. 10. 26, Claims, Examples, pp.53 & EP 1175223 A1 & JP 2003-517284 A	1-21

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03. 08. 2004

国際調査報告の発送日

24. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

川口 裕美子

4C 3127

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C(続き)	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	原田通成他, V $\alpha$ 14NK T細胞による自然免疫系と獲得免疫系の制御, 蛋白質核酸酵素, 2002, Vol. 47, No. 16, pp. 2109-2116	6-9, 16
A	加藤和則, 免疫疾患をめぐる基礎的研究の進歩 キラー細胞の細胞障害機構, 別冊・医学のあゆみ 免疫疾患, 医歯薬出版株式会社, 1995, pp. 48-50	13
A	森本純子他, オステオポンチンと免疫制御, Annual Review 免疫 2002, 株式会社中外医学社, 2001, pp. 151-157	1-21

## 第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ  配列表

配列表に関連するテーブル

b. フォーマット  書面

コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期  出願時の国際出願に含まれる

この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2.  さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

**第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）**

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 22、23 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
    請求の範囲22、23は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

**第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）**

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

**追加調査手数料の異議の申立てに関する注意**

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。